



Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica

Trabalho de Conclusão de Curso

**Estudo do Inibidor da 3-Hidróxi-3-Metilglutaril-
Coenzima A Redutase (Atorvastatina) na Transmissão
e Toxicidade Glutamatérgica**

Acadêmica: Ellen Stroeh

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carla Inês Tasca

Co-Orientadora: M.Sc. Cristiane Lima Carqueja

Florianópolis, julho de 2008.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	04
LISTA DE ABREVIATURAS.....	06
RESUMO.....	08
1. INTRODUÇÃO.....	09
1.1 Glutamato e Neurotoxicidade.....	09
1.2 Estatinas.....	14
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivo Geral.....	19
3.2 Objetivos Específicos.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1 Animais.....	20
4.2 Tratamento.....	20
4.3 Preparação e Incubação das Fatias.....	20
4.4 Privação de Glicose e Oxigênio.....	21
4.5 Dano Excitotóxico e Oxidativo.....	21
4.6 Ensaio de Viabilidade Celular.....	22
4.7 Captação de L-[³ H]Glutamato.....	22
4.8 Cirurgia Estereotáxica.....	23
4.9 Infusão Intracerebroventricular do Ácido Quinolínico (AQ).....	24
4.10 Padrões de Convulsões Induzidas por Ácido Quinolínico.....	24
4.11 Dosagem de Proteínas.....	24
4.12 Análise Estatística.....	25

5. RESULTADOS.....	26
6. DISCUSSÃO.....	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Figura esquemática da transmissão glutamatérgica.....	11
Figura 2: Via simplificada da biossíntese do colesterol.....	14
Figura 3: Avaliação da viabilidade celular em fatias hipocampais de ratos tratados com atorvastatina (1mg/kg) submetidas à Privação de Glicose e Oxigênio (PGO).....	27
Figura 4: Avaliação da viabilidade celular em fatias hipocampais de ratos tratados com atorvastatina (1mg/kg) submetidas ao dano com glutamato 1mM ou 10mM, NMDA 100µM ou peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) 100µM.....	29
Figura 5: Avaliação da captação de glutamato em fatias de hipocampo de animais tratados com atorvastatina (1mg/kg).....	31
Figura 6: Avaliação da captação de glutamato em fatias de córtex de animais tratados com atorvastatina (1mg/kg).....	32
Figura 7: Avaliação da captação de glutamato em fatias de cerebelo de animais tratados com atorvastatina (1mg/kg).....	33
Figura 8: Curva de captação de L[³ H]Glutamato em fatias de hipocampo de ratos tratados com atorvastatina (1mg/kg).....	34
Figura 9: Curva de captação de L[³ H]Glutamato em fatias de cerebelo de ratos tratados com atorvastatina (1mg/kg).....	35
Figura 10: Proteção contra convulsões induzidas por ácido quinolínico em animais tratados com atorvastatina (10mg/kg).....	37
Figura 11: Avaliação da viabilidade celular induzida por ácido quinolínico em fatias de hipocampo de animais tratados com atorvastatina (10mg/Kg).....	39
Figura 12: Avaliação da morte celular induzida por ácido quinolínico em hipocampus de animais tratados com atorvastatina (10mg/kg).....	41

Figura 13: Quantificação da morte celular induzida por ácido quinolínico em hipocampos de animais tratados com atorvastatina (10/mg/kg).....	42
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AK: Ácido Kaínico

AMPA: Ácido α -Amino-3-Hidróxi-5-Metil-4-Isoxazolepropiónico

AQ: Ácido Quinolínico

ATP: Adenosina-5'-Trifosfato

AVC: Acidente Vascular Cerebral

DMEM: Meio de Eagle Modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetil-Sulfóxido

EAAT: Transportador de Aminoácido Excitatório

eNOS: Óxido Nítrico Sintase Endotelial

GLAST: Transportador de Glutamato e Aspartato

GLT-1: Transportador de Glutamato

HBSS: Solução Salina Balanceada de Hanks

HMG-CoA: 3-Hidróxi-3-Metilglutaril-Coenzima A

i.c.v.: Intracerebroventricular

iNOS: Óxido Nítrico Sintase Induzida

i.p.: Intraperitoneal

IP: Iodeto de Propídeo

KRB: Krebs-Ringer Bicarbonato

mGluR: Receptor Metabotrópico de Glutamato

MTT: Brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-Difenil-Tetrazolium

NMDA: N-Metil-D-Aspartato

nNOS: Óxido Nítrico Sintase Neuronal

NO: Óxido Nítrico

NOS: Óxido Nítrico Sintase

PGO: Privação de Glicose e Oxigênio

s.c.: Subcutânea

SDS: Duodecil Sulfato de Sódio

SNC: Sistema Nervoso Central

RESUMO

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos participando da comunicação celular e diversas outras funções cerebrais. O excesso de glutamato no meio extracelular está associado ao fenômeno da excitotoxicidade que é fator comum a muitos distúrbios neurológicos, como doenças de Parkinson, Huntington e Alzheimer. As estatinas são inibidoras da 3-hidróxi-3-metilglutaril-Coenzima A (HMG-CoA) redutase, enzima marca-passo da biossíntese do colesterol. Estudos indicam que elas reduzem a incidência de acidente vascular cerebral e outras doenças neurodegenerativas além de protegerem neurônios em cultura do dano excitotóxico. Este estudo objetivou investigar o efeito do tratamento *in vivo* com um inibidor da enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril-Coenzima A redutase (atorvastatina) sobre o transporte de glutamato e danos celulares induzidos pela toxicidade glutamatérgica. Foi investigado o papel neuroprotetor da atorvastatina em modelos de isquemia, dano excitotóxico e oxidativo e no transporte glutamatérgico em ratos tratados com atorvastatina na dose de 1mg/Kg por 7 dias. Também se buscou avaliar a influência deste tratamento com a estatina em camundongos na dose de 10mg/Kg em um modelo de toxicidade glutamatérgica induzida por ácido quinolínico (AQ) *in vivo*. Os resultados demonstraram não haver proteção pelo tratamento de ratos com atorvastatina 1mg/Kg contra a privação de glicose e oxigênio (PGO, 15 ou 60 minutos seguidos de 2 horas de reperfusão), danos excitotóxicos induzidos por glutamato (1 ou 10 mM) ou N-metil-D-aspartato (NMDA, 100 μ M) e dano oxidativo (H₂O₂, 100 μ M) por 1 hora, em fatias de hipocampo. A viabilidade celular nos diferentes modelos utilizados foi avaliada pelo método da redução do MTT. A captação de L-[³H]glutamato em fatias hipocámpais, corticais e cerebelares, não foi significativamente alterada, da mesma forma que não houve modificação na cinética de captação de L-[³H]glutamato em fatias hipocámpais e cerebelares. O tratamento de camundongos com 10mg/Kg de atorvastatina por 7 dias protegeu contra 50% das convulsões e diminuiu a morte celular induzida por AQ (36,8 nmol, i.c.v.) tanto nos animais que convulsionaram quanto naqueles que não sofreram convulsão. A viabilidade celular foi avaliada pelo método da redução do MTT e a morte celular foi avaliada pela captação do Iodeto de Propídeo. A atorvastatina não demonstrou seu potencial neuroprotetor com a dose de 1mg/Kg. Entretanto, a dose de 10mg/Kg de atorvastatina protegeu contra convulsões e toxicidade induzidas por AQ, o que pode estar relacionado a um efeito neuroprotetor desta estatina, demonstrando sua possível utilização como uma estratégia terapêutica em quadros de doenças neurodegenerativas.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Glutamato e Neurotoxicidade

Os aminoácidos são as unidades monoméricas das proteínas, sendo estruturados por um grupo amina e um grupo carboxila ligados ao mesmo átomo de carbono, e também desempenham outras funções relevantes no organismo (Campbell, 2003). O aminoácido glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos, participa como mediador da comunicação intercelular, plasticidade, crescimento e diferenciação (Nedergaard *et al.*, 2002; Aarts & Tymianski, 2003), e também está envolvido em funções cerebrais vinculadas à aprendizagem e memória (Fonnum, 1984; Izquierdo, 1989; Meldrum, 2000). Entretanto, o glutamato parece estar presente na patogenia de doenças neurodegenerativas como as doenças de Parkinson, Huntington e Alzheimer (Greene & Greenemyre, 1996; Segovia *et al.*, 2001).

O glutamato promove suas ações através de interações com os seus receptores, que são classificados como metabotrópicos ou ionotrópicos. Os receptores metabotrópicos agem por intermédio da ativação da fosfolipase C ou por modulação da enzima adenilato ciclase (Obrenovitch & Urenjak, 1997). Evidências indicam que existem oito receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), subdivididos em três grupos de acordo com dados farmacológicos, mecanismos de transdução do sinal e similaridade na sequência de aminoácidos. O grupo I de mGluR (mGlu1 e mGlu5) estimula a fosfolipase C, enquanto o grupo II (mGlu2 e mGlu3) e o grupo III (mGlu4, mGlu6, mGlu7 e mGlu8) modulam a atividade da adenilato ciclase (Gubellini *et al.*, 2004; Swanson *et al.*, 2005).

Os receptores ionotrópicos subdividem-se naqueles que são ativados por N-metil-D-aspartato (NMDA); os que respondem ao ácido Kaínico (AK); e os que são sensíveis ao ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) (Michaelis, 1998). Fisiologicamente, os receptores AMPA e AK estão relacionados à transmissão sináptica rápida no SNC e são caracterizados pelas rápidas cinéticas de ativação e desativação (Popescu & Auerbach, 2004). Os receptores NMDA respondem mais lentamente ao glutamato e são considerados responsáveis pelos processos de aprendizado e memória.

Após a ação do glutamato sobre seus receptores, ele precisa ser retirado da fenda por transportadores específicos. Os transportadores astrocitários são responsáveis pela retirada do glutamato da fenda, pois não há uma enzima que o degrade, como ocorre para muitos neurotransmissores (Takahashi *et al.*, 1997).

Existem cinco proteínas de membrana diferentes que desempenham o papel de transportadores de glutamato e o retiram da fenda sináptica. Dois são transportadores astrocitários, denominados GLAST (Transportador de Glutamato e Aspartato) e GLT-1 (Transportador de Glutamato). Em humanos, estes transportadores são denominados EAAT1 e EAAT2 (Transportador de Aminoácido Excitatório). O EAAC1 (homólogo humano EAAT3) é o transportador neuronal mais amplamente distribuído no cérebro e é encontrado em regiões não sinápticas. Os outros subtipos clonados incluem EAAT4, em células de Purkinje, e EAAT5, encontrado em neurônios retinianos (Anderson *et al.*, 2001).

A captação celular de glutamato é acoplada ao transporte dos íons inorgânicos Na^+ e K^+ , sendo que o transporte de uma molécula de glutamato para dentro da célula é vinculado à entrada de três íons Na^+ e um próton e à saída de um íon K^+ (Nedergaard *et al.*, 2002). A atividade dos transportadores é inibida pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio, peróxido de hidrogênio e peroxinitrito, sendo a regulação do estado redox

da célula uma variável importante na manutenção dos níveis de glutamato na fenda sináptica (Kanai, 1997).

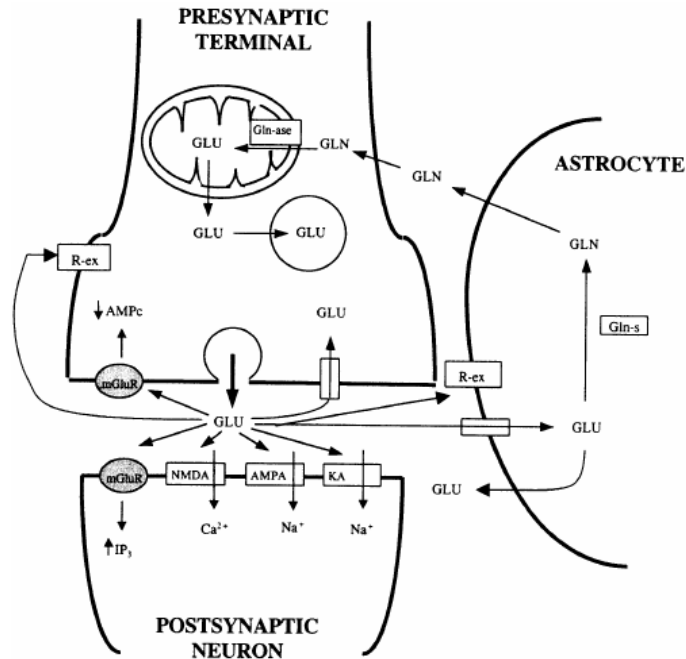


Figura 1: **Figura esquemática da transmissão glutamatérgica.** O glutamato estocado em vesículas no terminal sináptico, é liberado na fenda sináptica. Uma vez liberado, o glutamato pode atuar sobre seus receptores (metabotrópicos, NMDA, AMPA e AK) localizados nas células pós-sinápticas ou ser recaptado por neurônios ou células gliais através da ação de transportadores glutamatérgicos. Quando no astrócito, o glutamato é convertido a glutamina pela atividade da glutamina-sintase. Ela retorna ao neurônio pré-sináptico, onde será convertida a glutamato e este armazenado nas vesículas para uso posterior. (Segovia *et al.*, 2001).

Quando há um excesso de glutamato na fenda, ocorre um evento denominado excitotoxicidade, que é fator comum a diversos distúrbios neurológicos, como acidente vascular cerebral (AVC), epilepsia, e doenças neurodegenerativas (Obrenovitch & Urenjak, 1997). Ao agir nos receptores AMPA, NMDA e também nos metabotrópicos, o glutamato pode ser neurotóxico (Meldrum, 2000). A lesão excitotóxica é resultado da entrada em excesso de Ca^{2+} , levando a um aumento na sua concentração intracelular (Choi, 1987). Este aumento de Ca^{2+} intracelular ativa uma série de enzimas como proteases, fosfolipases, óxido nítrico sintases ou endonucleases que contribuem para a morte celular (Meldrum, 2000).

A excitotoxicidade está também associada ao dano neuronal decorrente de lesões isquêmicas ou traumáticas, onde há excessiva liberação de glutamato na fenda sináptica. Durante um evento isquêmico as células sofrem redução acentuada no suprimento sanguíneo, sendo privadas de glicose e oxigênio, o que leva a morte neuronal. Quando ocorre reperfusão (normalização do fluxo na área afetada), o excesso de oxigênio ofertado ultrapassa a demanda mitocondrial, o que leva a formação de espécies reativas de oxigênio, inativação dos sistemas de detoxificação e consumo dos antioxidantes endógenos (Vaughan & Delanty, 1999; Cucchiara & Kasner, 2001). Nesse processo, é importante a enzima óxido nítrico sintase (NOS). Sua forma induzida (iNOS) é um mediador inflamatório nos eventos de isquemia e reperfusão. O óxido nítrico (NO), e seu co-produto peroxinitrito, contribuem para morte neuronal durante a isquemia (Vaughan & Delanty, 1999). A isoforma endotelial (eNOS) apresenta papel protetor em eventos de redução do fluxo sanguíneo cerebral, pois leva à vasodilatação.

Fatias de hipocampo submetidas modelo de privação de glicose e oxigênio e posterior reperfusão apresentaram redução nos níveis de glutathione, importante antioxidante endógeno no SNC, e também uma redução na captação de glutamato do

meio extracelular, aumentando sua concentração na fenda e facilitando assim o processo de excitotoxicidade (Brongholi *et al.*, 2006).

A lesão causada por estresse oxidativo parece ser fator patogênico comum em diversas doenças neurológicas. A exposição ao composto H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) pode ser utilizada como modelo de processos que resultam em danos oxidativos no SNC (Whittemore *et al.*, 1995). Nesse sentido, é relevante que sejam estudadas drogas que possam agir reduzindo os efeitos negativos da excitotoxicidade glutamatérgica e do estresse oxidativo.

Além do glutamato, existem outros compostos capazes de ativar os receptores NMDA. O ácido quinolínico (AQ), um metabólito do aminoácido triptofano, é um agonista seletivo de receptor NMDA e mostra potência similar ao NMDA na indução de neurotoxicidade (Schawarcz *et al.*, 1983). A toxicidade promovida pelo ácido quinolínico através da ativação dos receptores NMDA leva a um desequilíbrio da homeostase dos íons cálcio (Ca^{2+}) intracelular, resultando na disfunção mitocondrial e conseqüente exaustão do ATP celular (Stone & Darlington, 2002; Naredo *et al.*, 2005).

O AQ induz convulsões através da sua ação sobre os receptores NMDA, particularmente, aqueles que possuem subunidades NR2B (Moroni, 1999; Schwarcz & Pellicciari, 2002). A toxicidade por AQ está relacionada a diversas patologias (Stone 2001), incluindo a epilepsia (Heyes, 1990). A administração cérebro-ventricular de AQ tem sido utilizada em modelos animais para induzir convulsões, observando-se convulsões tônico-clônicas e morte neuronal em diversas regiões hipocâmpais (Schmidt *et al.*, 2000; Ganzella *et al.*, 2006).

1.2 Estatinas

As estatinas são drogas utilizadas para reduzir os níveis séricos de colesterol. Elas agem através da inibição da enzima marca-passo da biossíntese do colesterol, a 3-hidróxi-3-metilglutaril-Coenzima A (HMG-CoA) redutase, que leva a redução de HMG-CoA a mevalonato (Nelson & Cox, 2000).

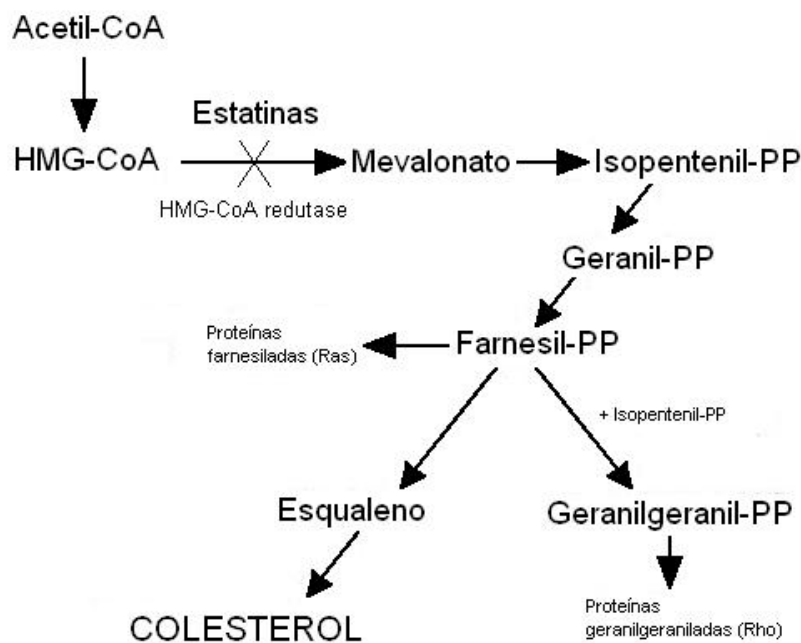


Figura 2: **Via simplificada da biossíntese do colesterol.** As estatinas agem inibindo a HMG-CoA redutase, enzima que converte o composto HMG-CoA a mevalonato. O mevalonato é convertido a outros compostos intermediários e termina por formar o colesterol ou seguir outro caminho e levar a um composto (geranylgeranil-pirofosfato) que é responsável por desempenhar outras funções. (Adaptada de http://www.unige.ch/cyberdocuments/theses2003/Dimitrova-TirefortY/these_body.html - em 02/06/08).

Atualmente, as estatinas são as drogas mais eficientes para o tratamento de pacientes com elevados níveis de colesterol no sangue (Stüve *et al.*, 2003; Lukiw *et al.*, 2005). Elas vêm sendo utilizadas clinicamente no tratamento de pacientes com doenças ateroscleróticas (Daimon *et al.*, 2004). Há também estudos demonstrando que as estatinas têm efeito benéfico na redução dos riscos e desenvolvimento de patologias cerebrais e cardiovasculares (Lukiw *et al.*, 2004), e apresentam papel neuroprotetor e redução de demência (Vaughan, 2003; Zacco *et al.*, 2003). Além disso, estudos sugerem que a prevalência da doença de Alzheimer é menor entre pacientes em uso de estatinas (Jick *et al.*, 2000; Wolozin *et al.*, 2000).

Stüve *et al.* (2003) afirmam que essa redução na incidência da doença de Alzheimer é devido aos efeitos pleiotrópicos das estatinas, ou seja, independentes da redução dos níveis de colesterol. Clinicamente, o uso de estatinas em indivíduos de 50 anos ou mais tem sido associado com uma diminuição de até 70% na prevalência dessa demência. Porém, este efeito não parece ser devido ao efeito da redução de lipídios pelas estatinas, pois indivíduos tratados com outros agentes capazes de diminuir a quantidade de lipídios não apresentam uma diminuição no risco para o desenvolvimento de Alzheimer (Stüve *et al.*, 2003).

As estatinas podem trazer benefícios em eventos de isquemia através da modulação da eNOS (Arnin-Hanjani *et al.*, 2001). Endres *et al.*, observou que o tratamento com atorvastatina reduziu a área infartada e melhorou o quadro neurológico em modelo de isquemia cerebral. Nesse estudo foi observado que houve um aumento na atividade da eNOS, sem alterar a expressão da nNOS (Endres *et al.*, 1998). Também há estudos que sugerem que as estatinas modulam a atividade da iNOS. A ativação da iNOS produz quantidades tóxicas de NO, fator relacionado a desordens no SNC como isquemia, Alzheimer e Huntington (Deckel *et al.*, 2001). A atorvastatina reduziu

estresse oxidativo através da diminuição de iNOS (Lee *et al.*, 2008). A lovastatina também reduziu o aumento da expressão de iNOS mediada por citocinas inflamatórias e a produção de NO em astrócitos e macrófagos de ratos. Considerando que a ativação da iNOS está relacionada com inúmeras desordens do SNC, sua inibição pelas estatinas pode reduzir processos inflamatórios que acompanham a isquemia aguda (Pahan *et al.*, 1997) e outras doenças, como doença de Alzheimer e a de Huntington (Lee *et al.*, 2008). Essas observações apontam para um duplo papel das estatinas na isquemia, estimulando a eNOS e inibindo a iNOS, atuando de modo sinérgico no sentido da neuroproteção.

Os isoprenóides são derivados de metabólitos intermediários da síntese de colesterol e servem como importantes moléculas lipídicas de adesão de muitas proteínas através da modificação pós-traducional, como proteínas G heterotriméricas e as monoméricas, como Ras e Rho. A isoprenilação é fundamental para a atividade de várias proteínas, possibilitando ligações covalentes, localização subcelular e transporte de proteínas para a membrana celular. Por exemplo, a translocação de Rho para a membrana celular é dependente da geranilgeranilação. Além de reduzir os níveis intracelulares de esteróides, as estatinas também reduzem a formação desses compostos intermediários da via de biossíntese do colesterol (Vaughan, 2003; Takemoto & Liao, 2001). Efeitos antiinflamatórios das estatinas podem ser atribuídos à diminuição da isoprenilação de proteínas envolvidas na inflamação e sinalização intracelular.

Foi demonstrado efeito neuroprotetor da atorvastatina em modelo animal de traumatismo crânio encefálico, reduzindo o déficit neurológico e aumentando a sinaptogênese, angiogênese e sobrevivência neuronal nos animais tratados por sete dias após o trauma (Lu *et al.*, 2004).

Além dos efeitos citados, as ações neuroprotetoras das estatinas também foram percebidas em modelo de toxicidade glutamatérgica. Bösel *et al.* (2005) demonstraram que concentrações na faixa de alto nanomolar a baixo micromolar de atorvastatina protegem neurônios corticais em culturas da excitotoxicidade mediada por glutamato quando esta droga é administrada dias antes do insulto.

As estatinas também protegeram neurônios em cultura da excitotoxicidade induzida por NMDA. Neste estudo, o efeito protetor das estatinas foi revertido quando as culturas foram tratadas simultaneamente com NMDA e mevalonato (um metabólito da via de biossíntese do colesterol) ou colesterol, sugerindo que a ação neuroprotetora está diretamente relacionada à redução dos níveis de colesterol na célula (Zacco *et al.*, 2003). No entanto, há estudos demonstrando efeitos protetores das estatinas independentes das reduções de colesterol, conhecidos como efeitos pleiotrópicos (Cimino *et al.*, 2007). Assim, acredita-se que são necessários mais estudos relacionando as estatinas com a excitotoxicidade glutamatérgica, a fim de determinar quais mecanismos estão relacionados com a neuroproteção.

2. JUSTIFICATIVA

Considerando-se a gravidade das doenças degenerativas do SNC, faz-se necessária a busca por medicamentos que possam amenizar este quadro.

Devido à importância da excitotoxicidade glutamatérgica como fator comum a muitas doenças neurodegenerativas e à inexistência de fármacos eficientes para o tratamento, considera-se fundamental o estudo de drogas que possam reverter esta toxicidade, através da modulação da transmissão de glutamato. Além disso, a busca por drogas anticonvulsivas também é de grande relevância. Portanto, se buscou investigar o papel da atorvastatina nessas situações, já que essa estatina tem demonstrado um elevado potencial neuroprotetor.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo investigar o efeito do tratamento *in vivo* com um inibidor da enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril-Coenzima A redutase (atorvastatina) sobre o transporte de glutamato e danos celulares induzidos pela toxicidade glutamatérgica.

3.2 Objetivos específicos

1. Investigar em fatias de hipocampo submetidas à privação de glicose e oxigênio o possível papel neuroprotetor da atorvastatina;
2. Avaliar se essa estatina protege contra danos excitotóxicos induzidos por NMDA, glutamato 1 e 10mM e contra dano oxidativo induzido por H₂O₂;
3. Estudar a captação de glutamato em fatias hipocampais, de córtex e de cerebelo de animais tratados com atorvastatina;
4. Investigar se o tratamento *in vivo* com a estatina previne a indução de convulsões causada pela administração intracerebroventricular de ácido quinolínico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (para a Privação de Glicose e Oxigênio, dano excitotóxico, oxidativo e captação de glutamato) ou camundongos Swiss machos adultos (para o modelo de convulsões e toxicidade induzidas por AQ) com 60 a 90 dias, provenientes do Biotério Central da UFSC e mantidos em ciclo de 12 horas claro e 12 horas escuro, com água e ração *ad libitum*. Os “Princípios Éticos do COBEA” foram seguidos durante todos os experimentos. O protocolo de pesquisa foi aprovado pela CEUA/UFSC.

4.2 Tratamento

Os ratos foram tratados oralmente durante 7 dias consecutivos com a dose de 1mg/Kg e os camundongos durante 7 dias na dose de 10mg/Kg/dia de atorvastatina, enquanto animais controle foram submetido ao tratamento com solução salina 0,9%.

4.3 Preparação e Incubação das Fatias

Os animais foram mortos por decapitação, seus hipocampus, córtex e cerebelos rapidamente dissecados e colocados em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB = NaCl 122mM; KCl 3mM; CaCl₂ 1,3mM; MgSO₄ 1,2mM; KH₂PO₄ 0,4mM; NaHCO₃ 25mM; D-glicose 10mM) gelado e gaseificado com carbogênio (95% O₂ - 5% CO₂)

para atingir o pH 7,4. As estruturas foram fatiadas utilizando-se um fatiador de tecidos McIlwain a 0,4mm de espessura.

4.4 Privação de Glicose e Oxigênio

A privação de glicose e oxigênio (PGO) é um modelo para simular as condições que ocorrem em uma situação de isquemia. As fatias do hipocampo foram pré-incubadas em tampão KRB por 30 min a 37° C, sendo gaseificadas com carbogênio. Fatias controle foram incubadas por 1 hora no tampão KRB e gaseificadas com carbogênio. Para obter-se a privação de glicose e oxigênio (PGO), a glicose do tampão KRB foi substituída por 10mM de 2-deoxi-glicose (um análogo não utilizável da glicose) e o tampão foi gaseificado com nitrogênio (Pocock & Nichols, 1998). As fatias foram incubadas neste tampão em PGO por 15 ou 60 minutos. O tampão da PGO foi substituído por tampão KRB gaseificado com carbogênio (fisiológico) e as fatias mantidas por um período de 2 horas de reperfusão. A incubação termina colocando-se as fatias em banho de gelo (4° C).

4.5 Dano Excitotóxico e Oxidativo

As fatias de hipocampo foram pré-incubadas com KRB, como já descrito, e depois submetidas ao dano excitotóxico com glutamato nas concentrações de 1mM ou 10mM, NMDA a 100μM (com glicina 10μM) ou ao dano oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 100μM durante 60 minutos. Em seguida, as fatias eram colocadas em meio de cultura composto por DMEM, 20mM Hepes e 100μM de gentamicina e mantidas a 37° em atmosfera de CO₂ durante 6 horas (Molz *et al.*, 2008).

4.6 Ensaio de Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi avaliada através da redução do MTT (Brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-Difenil-Tetrazolium), que é um sal de tetrazolium solúvel em água convertido a um formazam púrpura insolúvel após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (Jacobsson & Fowler, 1999). Após os modelos de danos celulares já descritos, as fatias hipocâmpais foram incubadas com MTT a 37° C e o formazam reduzido solubilizado pela adição de dimetil-sulfóxido (DMSO). A viabilidade celular é proporcional à leitura da absorbância medida em leitor de ELISA a 550nm.

Também foi realizada a captação de iodeto de propídeo (IP), um composto polar que entra apenas em células mortas ou com a membrana plasmática danificada. Quando está dentro da célula, o IP forma um complexo com o DNA e induz fluorescência vermelha (630nm) que é excitada por luz verde (495nm) (Boeck *et al.*, 2004). Após pré-incubação, as fatias hipocâmpais foram incubadas com IP (7µg/ml) à 37° C e depois lavadas uma vez com o tampão KRB para serem analisadas ao microscópio de epifluorescência invertido (Olympus IX 71), com filtro de rodamina. As imagens foram obtidas utilizando-se uma máquina fotográfica Olympus C5060, e quantificadas por análise densitométrica com o software Scion Image beta-3 (Scion Corporation).

4.7 Captação de L-[³H]Glutamato

A captação foi realizada conforme previamente descrito (Molz *et al.*, 2005). As fatias de hipocampo, córtex e cerebelo foram pré-incubadas por 15 minutos a 37° C, em solução salina balanceada de Hanks (HBSS = CaCl₂ 1,29mM, NaCl 136,9mM, KCl

5,36mM, MgSO₄ 0,65mM, Na₂HPO₄ 0,27mM, KH₂PO₄ 1,1mM, D-glicose 2mM e Hepes 5mM). A captação tem início com a adição de 0,33 µCi L-[³H]Glutamato e glutamato em uma concentração final de 100µM. Para fazer as curvas de concentração de glutamato, as concentrações finais utilizadas foram 1, 10, 25, 50, 100 ou 200µM. As fatias permaneciam por 7 minutos nesse meio de captação. A incubação é interrompida com a retirada do meio de captação e lavagem por duas vezes com 1 ml de HBSS gelado. 300µl de uma solução de NaOH 0,1N/SDS 0,01% foram adicionados para solubilização das fatias. Após a completa solubilização, foi determinado o conteúdo intracelular de glutamato pela avaliação de cintilação líquida. A captação de glutamato foi corrigida para a união não-específica em ensaios realizados na ausência de íons sódio, sendo este sal substituído pro cloreto de colina.

4.8 Cirurgia Estereotáxica

Inicialmente, os animais eram submetidos a uma injeção subcutânea (s.c.) na dose de 5µl/g de atropina 0,1%. Após 20 minutos os camundongos foram anestesiados com tiopental de sódio intraperitoneal (i.p.) na dose de 60mg/Kg. Foi implantada uma cânula de 7mm para infusão intracerebroventricular (i.c.v.) (Schmidt *et al.*, 2000). No aparelho esterotáxico a pele do crânio do animal era removida e uma cânula guia de 27 G/7mm implantada a 1mm posterior ao bregma, 1mm a direita da linha mediana, 1mm abaixo do ventrículo lateral e fixada com cimento acrílico. A cirurgia foi realizada no sétimo dia de tratamento com atorvastatina, e os animais ficavam durante 24 horas em recuperação antes da infusão do ácido quinolínico ou solução salina.

4.9 Infusão Intracerebroventricular do Ácido Quinolínico (AQ)

A infusão do AQ na concentração de 38,6 nmol *per sitio* (4µl – 9,2mM – i.c.v.) foi realizada com uma agulha 30 G/8mm colocada na cânula guia (Schmidt *et al.*, 2000; Boeck *et al.*, 2004). A ponta da agulha de infusão se projeta 1mm além da cânula, atingindo o ventrículo lateral direito. O AQ foi infundido durante 10 segundos e, em seguida, foi realizada a avaliação da convulsão induzida. Os animais controle foram infundidos com o mesmo volume de solução salina.

4.10 Padrões de Convulsões Induzidas por Ácido Quinolínico

Logo após a infusão do AQ os animais foram colocados em caixas de acrílico e observados por 10 minutos para a ocorrência de mudanças comportamentais como “wild running” (corrida involuntária), episódios convulsivos tônicos ou clônicos e convulsão tônico-clônica, que ocorrem por pelo menos 5 segundos (Hallak *et al.*, 1993). Os animais eram sacrificados 24 horas depois para as subseqüentes avaliações de viabilidade celular já descritas.

4.11 Dosagem de Proteínas

O conteúdo protéico das fatias foi determinado através do método de Lowry *et al.*, 1951, utilizando albumina bovina sérica como padrão.

4.12 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram avaliados através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do Teste de Duncan, quando necessário. Os testes comportamentais foram analisados através do Teste de Fisher. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

Estudos anteriores demonstraram que a prevalência da doença de Alzheimer é menor em pacientes que utilizam estatinas (Jick *et al.*, 2000). Essa classe de drogas também já demonstrou ações neuroprotetoras em modelo de toxicidade glutamatérgica em cultura (Zacco *et al.*, 2003). A atorvastatina provou reduzir diversos distúrbios neurológicos (Stepien *et al.*, 2005), o que sugere que as estatinas podem exercer amplo papel neuroprotetor. Lu *et al.*, 2004 e Lee *et al.*, 2008 obtiveram resultados através do tratamento com atorvastatina na dose de 1mg/Kg.

No presente estudo, ratos foram tratados com atorvastatina 1mg/Kg/dia durante 7 dias e submetidos aos modelos de isquemia (PGO), dano excitotóxico (com glutamato 1, 10 mM ou NMDA 100 μ M) e oxidativo (induzido por H₂O₂ 1mM).

No modelo de isquemia *ex vivo* (PGO), os resultados demonstraram que as fatias submetidas ao tampão isquêmico durante 15 ou 60 minutos mostraram viabilidade celular significativamente menor do que os grupos controle (Figura 3). Após a PGO de 15 ou 60 minutos, as fatias foram submetidas a um período de 2 horas de reperfusão. Houve uma pequena reparação de viabilidade celular nas fatias de hipocampo submetidas à PGO por 15 minutos e reperfusão, perdendo a significância estatística em relação ao controle. As fatias submetidas à PGO por 60 minutos e reperfusão mantiveram a redução na viabilidade celular, conforme já foi demonstrado (Brongholi *et al.*, 2006; Oleskovicz *et al.*, 2008). O tratamento com atorvastatina não apresentou alteração na viabilidade das fatias hipocampais quando comparado ao grupo salina submetido às mesmas condições (Figura 3).

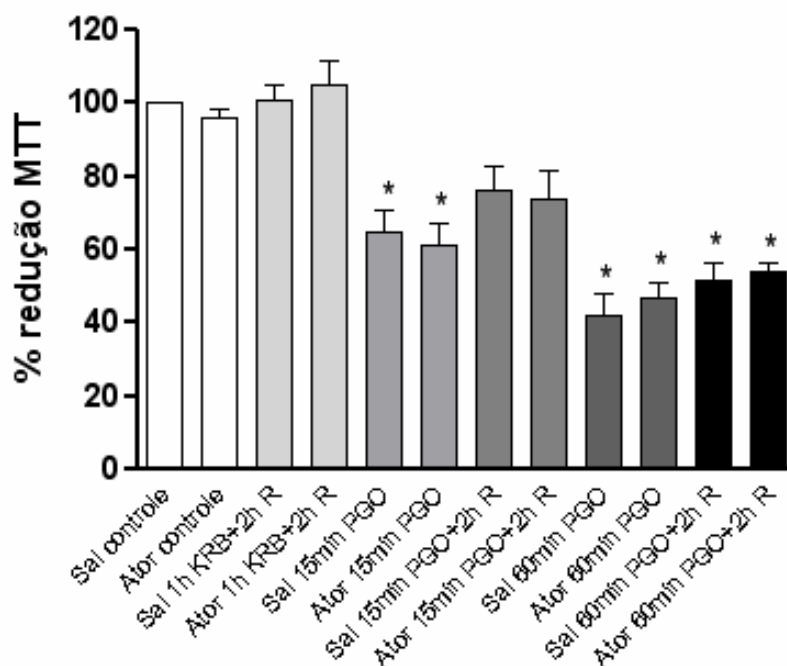


Figura 3: **Avaliação da viabilidade celular em fatias hipocâmpais de ratos tratados com atorvastatina (1mg/Kg) submetidas à Privação de Glicose e Oxigênio (PGO).** As fatias foram incubadas por 15 (15min) ou 60 minutos (60min) em tampão isquêmico, seguidos ou não de um período adicional de 2 horas (2h) de reperusão (R). Sal = salina, Ator = atorvastatina. A viabilidade celular foi avaliada por MTT. Fatias controle foram mantidas em tampão KRB durante todo o experimento. Os valores representam media \pm erro padrão de 4 experimentos realizados em triplicatas. * $P < 0,05$ quando comparados aos grupos controle.

Os danos excitotóxicos com glutamato 1 e 10mM apresentaram redução significativa da viabilidade celular quando comparados ao controle. NMDA (100 μ M) não reduziu a viabilidade. Na comparação entre os grupos controle (Salina) e os grupos tratados (Atorvastatina) não houve diferença significativa para esses danos (Figura 4).

O dano excitotóxico induzido por H₂O₂ 1mM reduziu significativamente a viabilidade após 60 minutos de incubação. O tratamento de ratos com atorvastatina (1mg/Kg) não apresentou reversão significativa dessa injúria, entretanto, houve uma tendência não estatisticamente significante de proteção contra o insulto oxidativo (Figura 4).

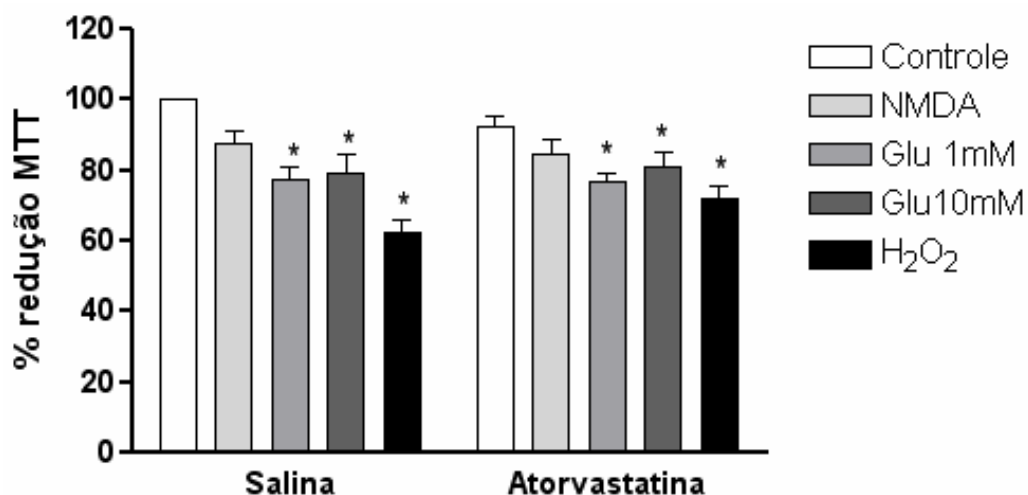


Figura 4: Avaliação da viabilidade celular em fatias hipocâmpais de ratos tratados com atorvastatina (1mg/Kg) submetidas ao dano com glutamato 1mM ou 10mM, NMDA 100 μ M ou peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 100 μ M. As fatias foram incubadas por 30 minutos em tampão KRB, e em seguida expostas ao glutamato 1 ou 10mM, NMDA ou peróxido de hidrogênio diluídos em KRB, por 60 minutos. A viabilidade celular foi avaliada por MTT. Fatias controle foram mantidas em tampão KRB durante todo o experimento. Os valores representam média \pm erro padrão de 5 experimentos realizados em triplicatas. * P<0,05 quando comparados ao grupo controle.

Para avaliar se a atorvastatina influenciaria no transporte glutamatérgico exercendo assim um papel no evento da excitotoxicidade, foi realizada a captação de glutamato em ratos tratados com a estatina durante 7 dias consecutivos na dose de 1mg/Kg.

Os resultados apontaram que a atorvastatina na dose utilizada não influenciou de maneira significativa no transporte de glutamato 100 μ M nas fatias de hipocampo (Figura 5), córtex (Figura 6) e cerebelo (Figura 7). Entretanto, os primeiros experimentos de transporte de glutamato apresentaram uma tendência de modificação na captação glutamatérgica em fatias de hipocampo e cerebelo (dados não mostrados).

Para investigar se essa tendência se confirmaria, foi realizada uma curva de concentração de glutamato (1 a 200 μ M) para que possíveis alterações na cinética de captação de glutamato fossem avaliadas. Essa curva de concentração demonstrou que há uma saturação na captação de glutamato a partir de 100 μ M (Figuras 8 e 9), e que esta cinética não é alterada pela atorvastatina tanto no hipocampo (Figura 8), quanto no cerebelo (Figura 9).

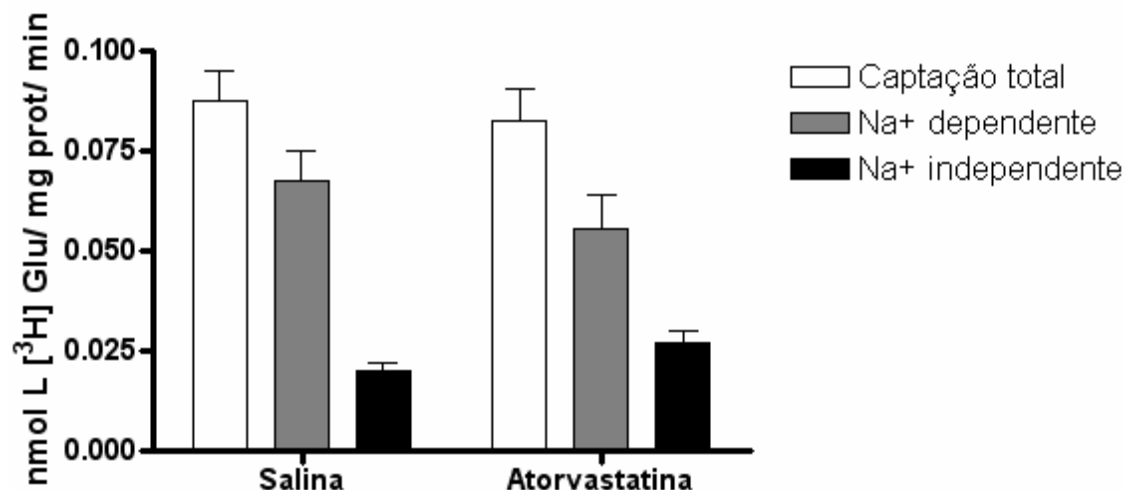


Figura 5: Avaliação da captação de glutamato em fatias de hipocampo de ratos tratados com atorvastatina (1mg/Kg). As fatias foram pré-incubadas por 15 min em HBSS e incubadas com 100 μ M L-[3H]glutamato por 7 min (a 37° C) para avaliar a captação total de glutamato. A captação independente de sódio (Na⁺ independente) foi realizada na ausência de íons sódio. A captação dependente de sódio (Na⁺ dependente) é a diferença entre a captação total e a independente de sódio. As barras representam a média \pm erro padrão de 10 experimentos realizados em triplicatas.

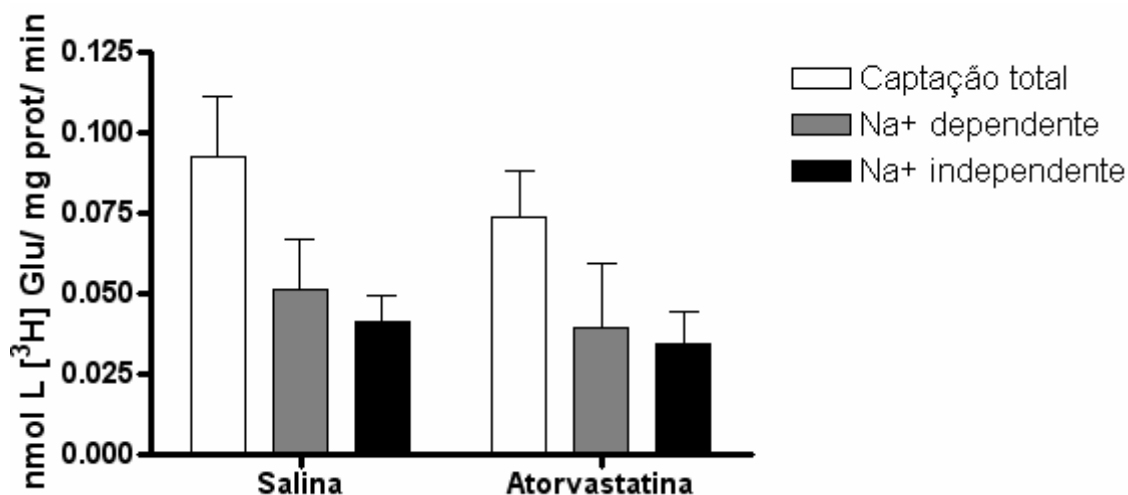


Figura 6: **Avaliação da captação de glutamato em fatias de córtex de ratos tratados com atorvastatina (1mg/Kg).** As fatias foram pré-incubadas por 15 min em HBSS e incubadas com 100 μ M L-[3H]glutamato por 7 min (a 37° C) para avaliar a captação total de glutamato. A captação independente de sódio (Na⁺ independente) foi realizada na ausência de íons sódio. A captação dependente de sódio (Na⁺ dependente) é a diferença entre a captação total e a independente de sódio. As barras representam a média \pm erro padrão de 6 experimentos realizados em triplicatas.

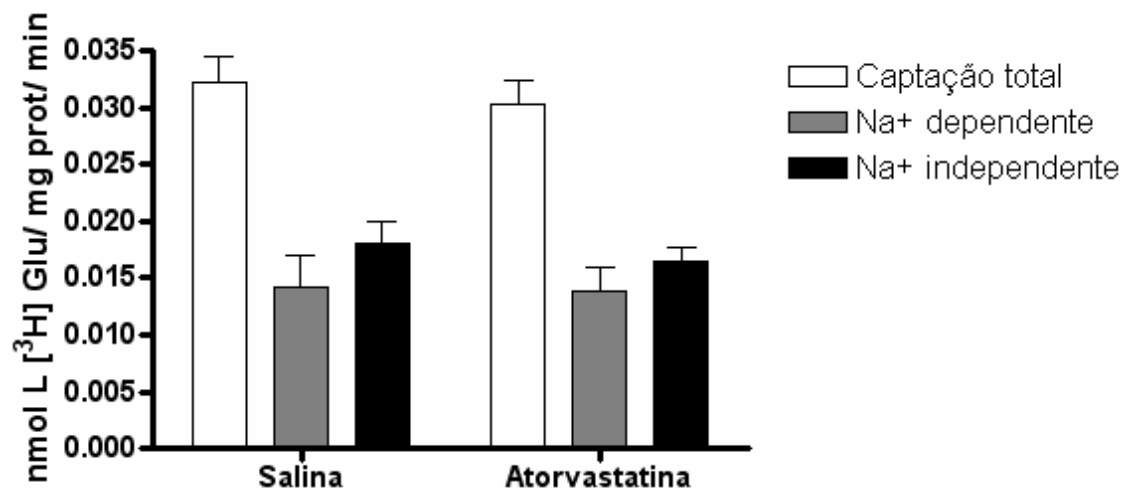


Figura 7: **Avaliação da captação de glutamato em fatias de cerebelo de ratos tratados com atorvastatina (1mg/Kg).** As fatias foram pré-incubadas por 15 min em HBSS e incubadas com 100 μ M L-[3H]glutamato por 7 min (a 37° C) para avaliar a captação total de glutamato. A captação independente de sódio (Na⁺ independente) foi realizada na ausência de íons sódio. A captação dependente de sódio (Na⁺ dependente) é a diferença entre a captação total e a independente de sódio. As barras representam a média \pm erro padrão de 11 experimentos realizados em triplicatas.

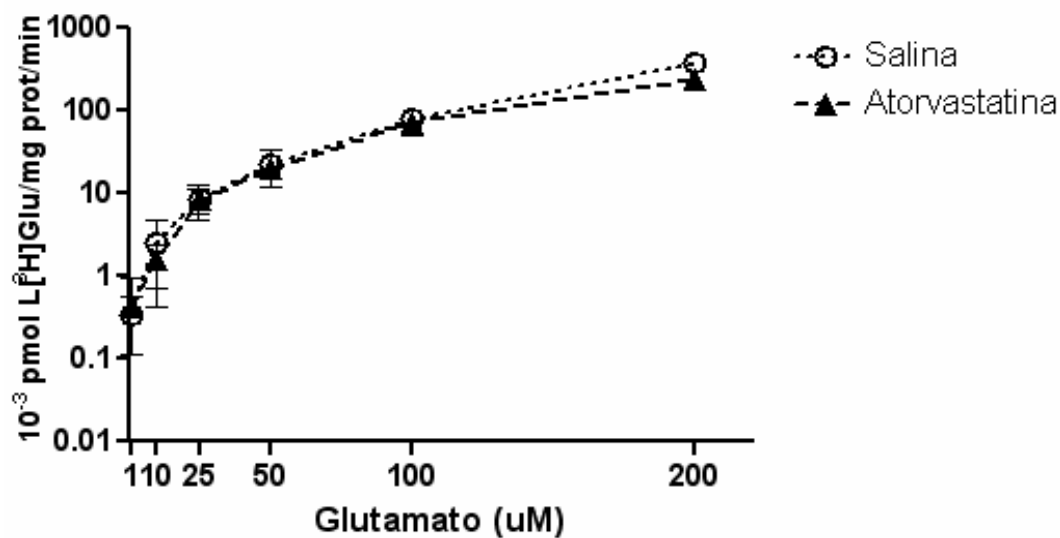


Figura 8: Curva de captação de L[³H]Glutamato em fatias de hipocampo de ratos tratados com atorvastatina (1mg/Kg). As fatias foram pré-incubadas por 15 min em HBSS e incubadas com 1, 10, 25, 50, 100 ou 200µM glutamato na presença de 0,33 µCi/ml de L-[³H]glutamato por 7 min (a 37° C). A captação independente de sódio foi realizada na ausência de íons sódio. O gráfico apresenta médias ± desvio padrão de 6 experimentos realizados em triplicatas.

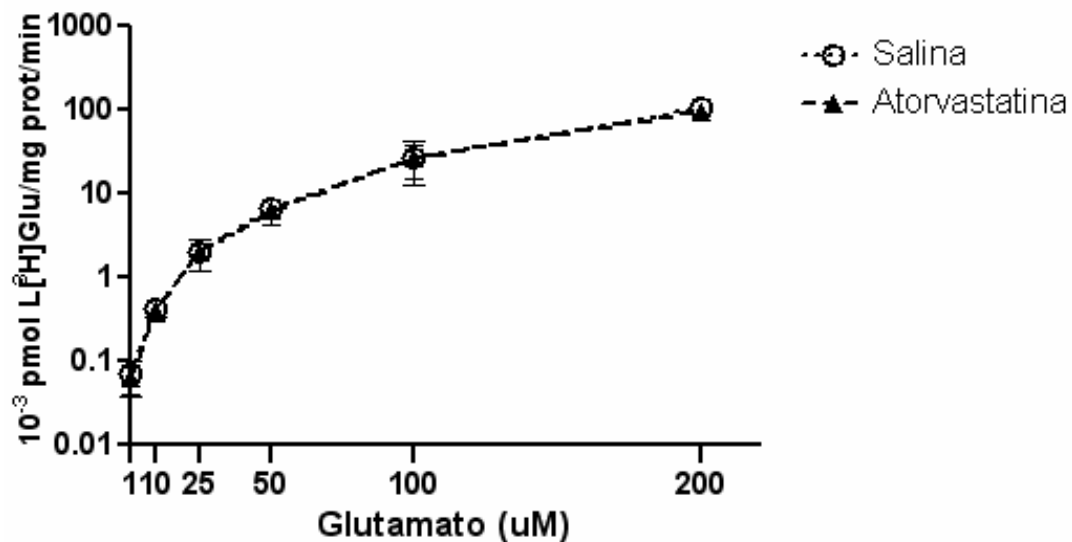


Figura 9: Curva de captação de L-[³H]Glutamato em fatias de cerebelo de ratos tratados com atorvastatina (1mg/Kg). As fatias foram pré-incubadas por 15 min em HBSS e incubadas com 1, 10, 25, 50, 100 ou 200μM glutamato na presença de 0,33 μCi/ml de L-[³H]glutamato por 7 min (a 37° C). A captação independente de sódio foi realizada na ausência de íons sódio. O gráfico apresenta médias ± desvio padrão de 6 experimentos realizados em triplicatas.

De acordo com Dall Agnolo, 2007, as convulsões induzidas por ácido quinolínico foram evitadas em 13% dos animais tratados com atorvastatina durante 7 dias na dose de 1mg/Kg. Como esse resultado mostrou que a atorvastatina exerce uma proteção nessa situação e outros diversos estudos obtiveram neuroproteção com a dose de 10mg/Kg (Yrjänheikki *et al.*, 2005), o presente trabalho investigou os resultados do tratamento de camundongos com a dose de 10mg/Kg em episódios convulsivos induzidos por AQ.

Os animais utilizados para a avaliação do tratamento com atorvastatina na dose de 10/mg/Kg nas convulsões induzidas por AQ foram divididos em cinco grupos diferentes: aqueles que eram tratados oralmente com salina e recebiam também salina i.c.v para controle (Salina/Salina); os que recebiam salina durante o tratamento oral e AQ i.c.v para sofrerem convulsão (Salina/AQ); outros recebiam atorvastatina durante os 7 dias e salina i.c.v para controle tratado (Atorvastatina/Salina); os que recebiam atorvastatina e AQ e sofriam convulsões (Atorvastatina/AQ – Convulsionados) e ainda; aqueles que eram tratados com atorvastatina, recebiam AQ e não convulsionaram (Atorvastatina/AQ – Não convulsionados).

A dose de 10mg/kg de atorvastatina obteve 50% ($P=0,0016$) de proteção contra as convulsões induzidas por ácido quinolínico (Figura 10).

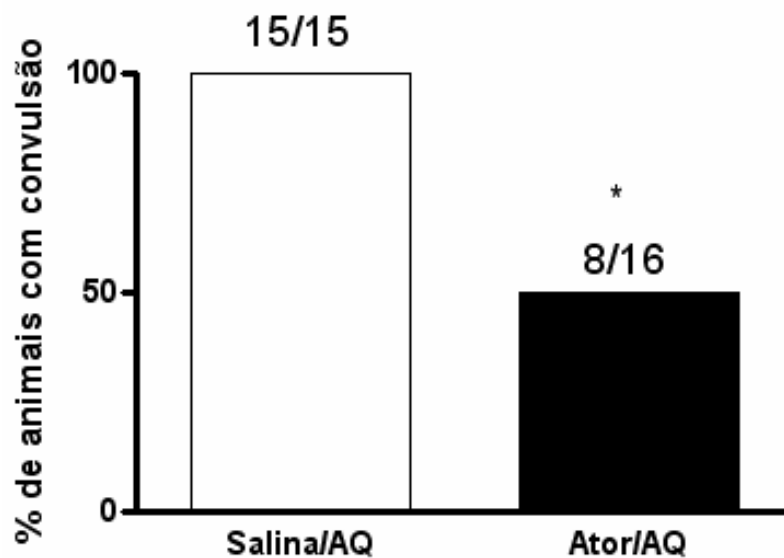


Figura 10: **Proteção contra convulsões induzidas por ácido quinolínico em camundongos tratados com atorvastatina (10mg/Kg).** Os animais foram tratados durante 7 dias consecutivos com atorvastatina e, após a cirurgia estereotáxica receberam AQ i.c.v. O comportamento dos animais foi analisado e classificado se ele sofria ou não convulsão. * $P=0,0016$

Foi investigado o efeito da atorvastatina na toxicidade hipocampal induzida pela administração de ácido quinolínico em camundongos tratados com atorvastatina na dose de 10mg/Kg. Nas análises de viabilidade celular com MTT foi demonstrado que há aumento na morte celular hipocampal dos animais 24 horas depois de receberem ácido quinolínico (i.c.v.). Esse efeito foi reduzido pelo pré-tratamento com 10mg/Kg de atorvastatina durante 7 dias antes da infusão de AQ, tanto nos animais que convulsionaram quanto naqueles que não sofreram convulsão. Apenas o tratamento com a atorvastatina não exerceu influência sobre a viabilidade celular, quando relacionados com o grupo controle (Salina/Salina) (Figura 11).

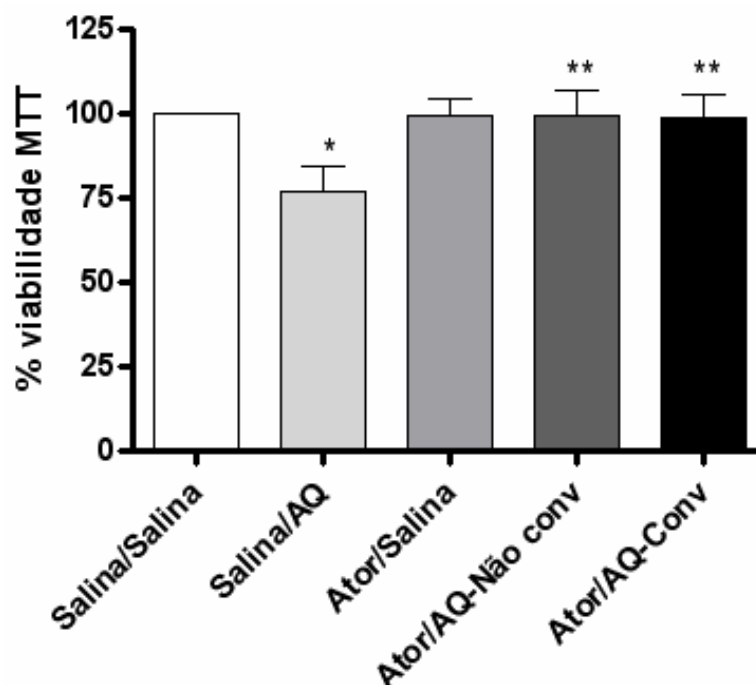


Figura 11: Avaliação da viabilidade celular induzida por ácido quinolínico em fatias de hipocampo de camundongos tratados com atorvastatina (10mg/Kg). Os animais foram tratados com atorvastatina 10/mg/Kg ou salina 0,9% durante 7 dias. Após o tratamento, eles foram operados para receberem uma cânula direcionada ao ventrículo lateral direito, onde recebiam ácido quinolínico. 24 horas depois os animais foram mortos e seus hipocampos submetidos ao método de redução do MTT para avaliar a viabilidade celular. O gráfico mostra as médias \pm erro padrão. Os grupos tiveram N de, respectivamente, 6, 4, 5, 6 e 6, e eram feitos em quintuplicatas. * $P < 0,05$ comparado ao grupo Salina/Salina. ** $P < 0,05$ comparados com o grupo Salina/AQ.

Para avaliar a morte celular induzida pelo AQ foi realizado o método da captação de iodeto de propídeo que avalia a morte celular por necrose. Esse composto é polar e entra em células mortas ou com a membrana danificada, formando um complexo com o DNA que corresponde às regiões de cor clara (Figura 12). Nas fatias obtidas de animais infundidos com AQ observa-se maior incorporação de IP em relação aos controles (Figuras 12 e 13). O grupo dos camundongos tratados com atorvastatina 10mg/Kg (Ator/Salina) quando comparados com o grupo controle (Salina/Salina) não tiveram diferenças para a quantificação da viabilidade celular e aqueles que foram tratados com a estatina e receberam AQ tiveram uma reversão do dano (Figura 13).

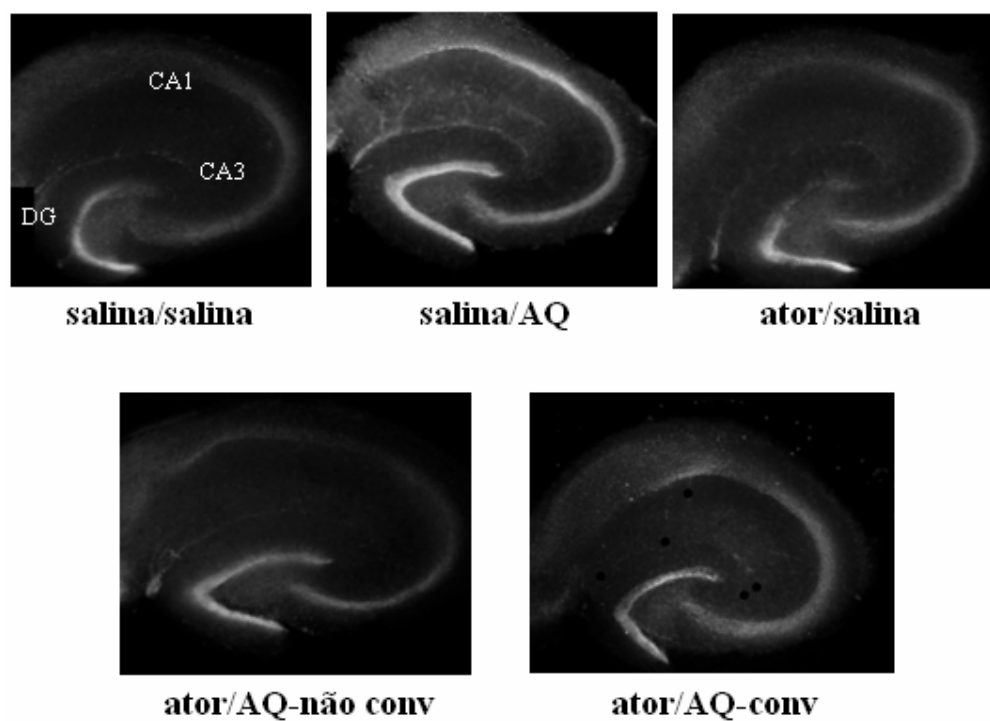


Figura 12: Avaliação da morte celular induzida por ácido quinolínico em hipocampus de camundongos tratados com atorvastatina (10mg/kg) por 7 dias. 24 horas após a infusão de AQ os animais foram mortos e seus hipocampus submetidos à quantificação da morte celular pela captação de iodeto de propídeo. As regiões claras correspondem a uma maior incorporação de IP. As regiões do giro denteado, CA1 e CA3 estão indicadas na primeira foto.

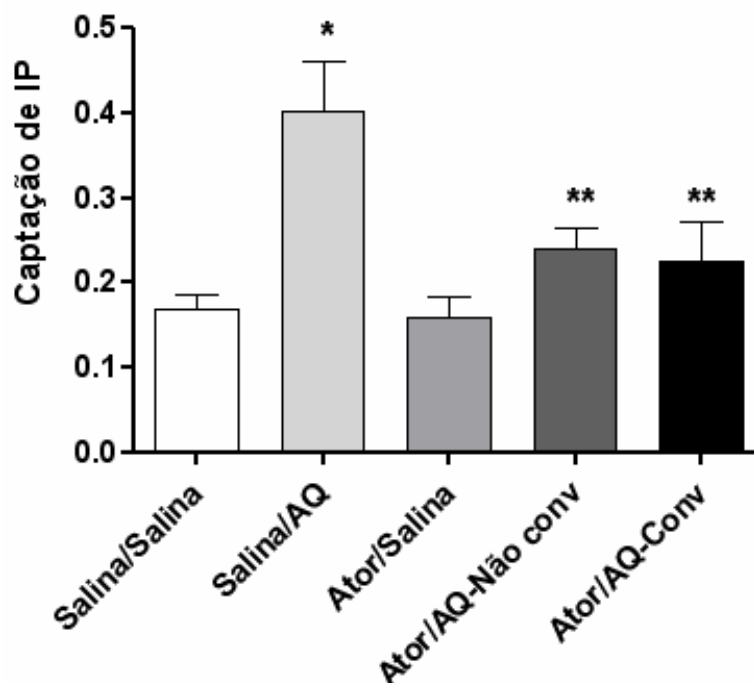


Figura 13: **Quantificação da morte celular induzida por ácido quinolínico em hipocampus de camundongos tratados com atorvastatina (10/mg/kg).** As imagens obtidas pela câmera acoplada ao microscópio foram analisadas com o programa de computador Scion Image. A área clara representando IP é detectada pela análise densitométrica. Os valores representam as médias \pm erro padrão. Os grupos tiveram N de, respectivamente, 4, 3, 3, 4 e 4 e eram feitos em quintuplicatas. * $P < 0,01$ comparado ao grupo Salina/Salina. ** $P < 0,05$ comparados ao grupo Salina/AQ.

6. DISCUSSÃO

Os inibidores da HMG-CoA redutase têm demonstrado muitas propriedades neuroprotetoras (Clarke *et al.*, 2007). As estatinas têm sido eficientes na redução dos riscos e desenvolvimento de diversas patologias cerebrais e cardiovasculares (Lukiw *et al.*, 2005). Há diversas evidências sugerindo que essas drogas podem apresentar papel neuroprotetor e redução de demências (Vaughan, 2003; Zacco *et al.*, 2003). Além disso, já foram demonstradas suas ações neuroprotetoras em modelo de toxicidade glutamatérgica induzida por NMDA (Zacco *et al.*, 2003).

Sabe-se que a atorvastatina é relativamente lipofílica (Schachter, 2005), demora mais para ser eliminada do plasma quando comparada com outras estatinas (Lennernas, 2003) e foi confirmada a segurança de suas altas doses (Waters, 2005). Além disso, essa estatina provou ser neuroprotetora em diversos distúrbios neurológicos (Stepien *et al.*, 2005) e exercer efeitos benéficos através da proteção contra a excitotoxicidade induzida por glutamato, tendo assim, possíveis implicações terapêuticas em doenças neurológicas (Bösel *et al.*, 2005).

Os presentes resultados demonstraram que a atorvastatina não exerceu proteção na concentração utilizada (1mg/Kg/dia) na privação de glicose e oxigênio e dano excitotóxico. Esse tratamento também não alterou o transporte de glutamato. No cerebelo há uma captação independente de sódio maior quando comparada à das outras estruturas, isso está de acordo com dados na literatura que demonstram que no cerebelo os transportadores de glutamato (EAAT4) apresentam menor dependência de íons sódio, utilizando-se de íons cloreto (Nedergaard *et al.*, 2002).

A dose inicialmente utilizada (1 mg/Kg) já demonstrou efeitos neuroprotetores em modelos de recuperação pós-trauma, reduzindo o déficit neurológico e aumentando a

sinaptogênese, angiogênese e sobrevivência neuronal em animais tratados por sete dias, como demonstrou Lu *et al.*, 2004. Lee *et al.*, 2008 também demonstrou que a dose de 1mg/Kg reduz déficits neurológicos, lesão no estriado e diminui morte apoptótica induzidos por uma toxina mitocondrial. Há também de se considerar que 1mg/Kg é a dose que mais se aproxima da dose utilizada em seres humanos, já que um comprimido tem 80mg (Laufs *et al.*, 2001) e, clinicamente, a atorvastatina é bem tolerada em até 80mg/dia (Amarenco *et al.*, 2006). Entretanto, nos modelos utilizados para o presente estudo em busca de uma possível neuroproteção, a dose de 1mg/Kg/dia não demonstrou efeitos significativos.

Há estudos mostrando neuroproteção pelo pré-tratamento com atorvastatina na dose de 10mg/Kg/dia em modelo de isquemia *in vivo* (Yrjänheikki *et al.*, 2005), o que mostra mais uma vez os benefícios das estatinas, que, no presente trabalho não foram demonstrados no modelo de isquemia *ex vivo*, possivelmente, por causa da dose utilizada para o modelo de isquemia.

Neste trabalho, também se buscou demonstrar se o efeito neuroprotetor da atorvastatina seria demonstrado em danos causados por ácido quinolínico, e os resultados demonstram que essa estatina confere uma proteção contra convulsões e morte celular.

Os dados obtidos mostraram que a atorvastatina protege contra 50% das convulsões induzidas por AQ. Além disso, houve uma proteção contra a indução de morte celular pelo AQ em hipocampo de camundongos, mesmo nos animais que tiveram convulsões.

O AQ é muito utilizado como estratégia farmacológica para induzir convulsões (Schmidt *et al.*, 2000) e assim poder estudar maneiras de evitá-las. O mecanismo de toxicidade do AQ já está bem descrito, este se dá através do sistema glutamatérgico pela

ativação de receptores NMDA (Stone, 1993). Recentes estudos mostraram que o AQ aumenta a liberação sinaptossomal de glutamato e inibe sua captação em cultura de astrócitos (Tavares *et al.*, 2002). Além disso, a excitotoxicidade induzida por AQ tem sido relacionada ao aumento da quantidade de espécies reativas de oxigênio e o conseqüente estresse oxidativo (Ganzella *et al.*, 2006).

O presente estudo demonstrou que o AQ causou morte celular pela redução do MTT, um teste colorimétrico amplamente utilizado para a avaliação de viabilidade celular. O pré-tratamento com a atorvastatina conferiu uma proteção contra a redução de viabilidade induzida pelo AQ. Estudos *in vitro* com insulto glutamatérgico também mostraram resultados semelhantes a atorvastatina. (Bosöl *et al.*, 2005).

A captação de iodeto de propídeo revelou danos evidentes nas regiões dos hipocampus dos camundongos que receberam a infusão do AQ. Estudos prévios também demonstraram dano celular depois da infusão do AQ (Behan & Stone, 2002). Boeck *et al.* (2004) demonstrou um aumento na captação de IP em fatias hipocampais induzida por administração de AQ *in vivo*. A coloração com IP indica que a membrana celular foi danificada, já que esse composto é impermeável a células com a membrana íntegra.

Nas regiões CA1 e CA3 dos camundongos tratados com atorvastatina é possível observar menor fluorescência se comparadas ao giro denteado. Muitos estudos mostram que a atorvastatina realmente protege contra a despolarização de neurônios piramidais na região CA1 (Wallis and Panizzon, 2005) e reduz morte neuronal na região CA3 (Lu *et al.*, 2007).

O mecanismo pelo qual a atorvastatina protege os camundongos das convulsões e da morte celular induzida por AQ ainda não está claro. Efeitos modulatórios da atorvastatina sobre o sistema glutamatérgico têm sido estudados. Elas podem tornar

neurônios corticais mais resistentes à toxicidade por NMDA (Zacco *et al.*, 2003), e reduzir a excessiva entrada de cálcio associada com a perturbação da função desse receptor (Bosel *et al.*, 2005).

Além disso, estudos sugerem que há relação do mecanismo de ação das estatinas reduzindo os níveis de colesterol com a diminuição da associação dos receptores NMDA aos “lipid rafts” (Ponce *et al.*, 2008), diminuindo o estresse oxidativo nos neurônios (Hayashi *et al.*, 2005), modulando a atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Laufs *et al.*, 2000) e interferindo na via dos isoprenóides (Cordle *et al.*, 2005).

Este estudo demonstrou que, em modelo animal, o tratamento com atorvastatina na dose de 1mg/Kg não exerceu efeitos nos modelos de privação de glicose e oxigênio e dano excitotóxico e oxidativo *ex vivo*. Essa dose também não alterou o transporte de glutamato. Porém, são necessários mais estudos com esses modelos, utilizando-se, por exemplo, da dose de 10mg/Kg, para verificar se o efeito neuroprotetor da atorvastatina irá se confirmar.

Como a dose de 10mg/Kg protegeu contra 50% das convulsões induzidas por AQ e protegeu o hipocampo da morte celular também induzida pelo AQ, mostrou-se que, nesse modelo, o potencial neuroprotetor da atorvastatina foi confirmado. Assim, acredita-se que o tratamento com estatinas pode ser futuramente utilizado como estratégia na prevenção dos danos em quadros de epilepsia e outras doenças neurodegenerativas que estão vinculadas à excitotoxicidade causada pela ativação dos receptores NMDA.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARTS, M. M. & TYMIANSKI, M. Novel treatment of excitotoxicity: targeted disruption of intracellular signalling from glutamate receptors. *Biochem. Pharmacol.* 66:877-886, 2003.
- AMARENCO, P.; BOGOUSLAVSKY, J.; CALLAHAN, A. 3RD.; GOLDSTEIN, L. B.; HENNERICI, M.; RUDOLPH, A. E.; SILLESEN, H.; SIMUNOVIC, L.; SZAREK, M.; WELCH, K. M.; ZIVIN, J. A. High-dose atorvastatin after stroke or transient ischemic attack. *N. Engl. J. Med.* 355, 549–559, 2006.
- ANDERSON, C. M.; BRIDGES, R. J.; CHAMBERLIN, A. R.; SHIMAMOTO, K.; YASUDA-KAMATAMI, Y.; SWANSON, R. A. Differing effects of substrate and non-substrate transport inhibitors on glutamate uptake reversal. *J. Neurochem.* 79: 1207-1216, 2001.
- ARNIN-HANJANI, S.; STAGLIANO, N. E.; YAMADA, M.; HUANG, P. L.; LIAO, J. K.; MOSKOWITZ, M. A. Mevastatin, an HMG-CoA Reductase Inhibitor, Reduces Stroke Damage and Upregulates Endothelial Nitric Oxide Synthase in Mice. *Stroke.* 32: 980-986, 2001.
- BALDO, B. A. Protein blotting: research, applications and its place in protein separation methodology In: *Advances in Electrophoresis*, ed. by A. Chranbach, M.D. Dunn and B.J. Radola, 7: 7-478, VCH, 1994.
- BEHAN W. M. H.; STONE, T. W. Enhanced neuronal damage by co-administration of quinolinic acid and free radicals, and protection by adenosine A2A receptor antagonists. *British Journal of Pharmacology.* 135(6):1435-42, 2002.
- BOECK, C. R.; GANZELLA, M.; LOTTERMANN, A.; VENDITE, D. NMDA preconditioning protects against seizures and hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid in mice. *Epilepsia.* 45(7):745-750, 2004.
- BÖSEL, J.; GANDOR, F.; HARMS, C.; SYNOWITZ, M.; HARMS, U.; DJOUFACK, P. C.; MEGOW, D.; DIRNAGL, U.; HÖRTNAGL, H.; FINK, B. K.; ENDRES, M. Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurons. *J. Neurochem.* 92:1386-1398, 2005.
- BRONGHOLI, K.; SOUZA, D. G.; BAINY, A. C.; DAFRE, A. L.; TASCA, C. I. Oxygen-glucose deprivation decreases glutathione levels and glutamate uptake in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 1083(1):211-8, 2006.

- BUNN, S. J.; SIM, A. T. R.; HERD, L. M.; AUSTIN, L. M.; DUNKLEY, P. R. Tyrosine hydroxylase phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells: The role of intracellular calcium in the Ser⁸, Ser¹⁹, Ser³¹ and Ser⁴⁰. J. Neurochem. 64: 1370-1378, 1995.
- CAMPBELL, M. K. Bioquímica. 3^a ed: Artmed Editora, 2003.
- CHOI, D. W. Ionic Dependence of Glutamate Neurotoxicity. J. Neurosci. 7(2): 369-379, 1987.
- CIMINO, M.; GELOSA, P.; GIANELLA, A.; NOBILI, E.; TREMOLI, E.; SIRONI, L. Statins: Multiple Mechanisms of Action in the Ischemic Brain. Neuroscientist. 13: 208, 2007.
- CLARKE, R.; O'CONNELL, F.; LYONS, A.; LYNCH, M. A. The HMG-CoA reductase inhibitors, atorvastatin, attenuates the effects of acute administration of amyloid- β_{1-42} in the rat hippocampus *in vivo*. Neuropharm. 52: 136-145, 2007.
- COLLINS, E. & SIM, A. T. R. Regulation of neuronal PP1 and PP2 during development. Meth. Mol. Biol. 38: 21-43, 1998.
- CORDLE, A.; KOENIGSKNECHT-TALBOO, J.; WILKINSON, B.; LIMPET, A.; LANDRETH, G. Mechanisms of statin-mediated inhibition of small G-protein function. Biol Chem. 80(40):34202-9, 2005.
- CUCCHIARA, B. & KASNER, S. E. Use of statins in CNS disorders. J. Neurol. Sci. 187: 81-89, 2001.
- DAIMON, M.; AOMI, S.; KAWAMATA, T.; KUROSAWA, H. Pravastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, reduces delayed neuronal death following transient forebrain ischemia in the adult rat hippocampus. Neurosci. Lett. 362: 122-126, 2004.
- DALL AGNOLLO, D. Avaliação de neuroproteção por atorvastatina na toxicidade induzida por ácido quinolínico em camundongos. Trabalho de Conclusão de Curso, UFSC, 2007.
- DECKEL A. W., GORDINIER A., NUTTAL D., TANG V., KUWADA C., FREITAS R. AND GARY K. A. Reduced activity and protein expression of NOS in R6/2 HD transgenic mice: effects of L-NAME on symptom progression. Brain Res. 919, 70-81, 2001.
- ENDRES, M.; LAUFS, U.; HUANG, Z.; NAKAMURA, T.; HUANG, P.; MOSKOWITZ, M. A.; LIAO, J. K. Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A

- reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8880-8885, 1998.
- FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* 42:1-11, 1984.
- GANZELLA, M.; JARDIM F. M.; BOECK, C. R.; VENDITE, D. Time course of oxidative events in the hippocampus following intracerebroventricular infusion of quinolinic acid in mice. *Neurosci Res.* 55: 397-402, 2006.
- GREENE, J. G. & GREENAMYRE, J. T. Bioenergetics and Glutamate Toxicity. *Progr. Neurobiol.* 48: 613-634, 1996.
- GUBELLINI, P.; PISANI, A.; CENTONZE, D.; BERNARDI, G.; CALABRESI, P. Metabotropic glutamate receptors and striatal synaptic plasticity: implications for neurological diseases. *Prog Neurobiol.* 74: 271-300, 2004.
- HALLAK, M.; IRTENKAUF, S. M.; JANUSZ, C. A.; COTTON, D. B. Stimulation and inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in rats: developing a seizure model. *J Obstet Gynecol.* 169(3): 695-700, 1993.
- HAYASHI, T.; HAMAKAWA, K.; NAGOTANI, S.; JIN, G.; LI, F.; DEGUCHI, K.; SEHARA, Y.; ZHANG, H.; NAGANO, I.; SHOJI, M.; ABE, K. HMG CoA reductase inhibitors reduce ischemic brain injury of Wistar rats through decreasing oxidative stress on neurons. *Brain Res.* 1037(1-2): 52-8, 2005.
- IZQUIERDO, I. Pre and Postsynaptic events in long term potentiation in memory. *FASEB.* 8: 1113-1139, 1989.
- JICK, H.; ZORNBERG, G. L.; JICK, S. S.; SESHADRI, S.; DRACHMAN, D. A. Statins and the risk of dementia. *Lancet.* 356: 1627-1631, 2000.
- KANAI, Y. Family of neutral and acidic amino acid transporters: molecular biology, physiology and medical implications. *Curr. Op. Cell Biol.* 9: 565-572, 1997.
- LAUFS, U.; GERTZ, K.; HUANG, P.; NICKENIG, G.; BÖHM, M.; DIRNAGL, U.; ENDRES, M. Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke.* 31 (10): 2442-9, 2000.
- LAUFS, U.; WASSMANN, S.; HILGERS, S.; RIBAUDO, N.; BÖHM, M.; NICKENIG, G. Rapid effects on vascular function after initiation and withdrawal of atorvastatin in healthy, normocholesterolemic men. *Am J Cardiol.* 88(11):1306-7, 2001.

- LEE, S. T.; CHU, K.; PARK, J. E.; HONG, N. H.; IM, W. S.; KANG, L. HAN, Z.; JUNG, K. H.; KIM, M. W.; KIM, M. Atorvastatin attenuates mitochondrial toxin-induced striatal degeneration, with decreasing iNOS/c-Jun levels and activating ERK/Akt pathways. *J Neurochem.* 104(5):1190-200, 2008.
- LENNERNAS, H. Clinical and pharmacokinetics of atorvastatin. *Clin. Pharmacokinet.* 42, 1141-1160, 2003.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
- LU, D.; GOUSSEV, A.; CHEN, J.; PANNU, P.; LI, Y.; MAHMOD, A.; CHOPP, M. Atorvastatin Reduces Neurological Deficit and Increases Synaptogenesis, Angiogenesis, and Neuronal Survival in Rats Subjected to Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma.* 21(1): 21-32, 2004.
- LU D.; QU C, GOUSSEV, A.; JIANG, H.; LU, C.; SCHALLERT, T.; MAHMOOD, A.; CHEN, J.; LI, Y.; CHOPP, M. Statins increase neurogenesis in the dentate gyrus, reduce delayed neuronal death in the hippocampal CA3 region, and improve spatial learning in rat after traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 24 (7):1132-46, 2007.
- LUKIW, W. J.; PAPPOLLA, M.; PELAEZ, R. P.; BAZAN, N. G. Alzheimer's disease – a dysfunction in cholesterol and lipid metabolism. *Cell. Mol. Neurobiol.* 25: 475-483, 2005.
- MELDRUM, B. S. Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology. *J. Nutr.* 130: 1007S-1015S, 2000.
- MICHAELIS, E. K. Molecular Biology of Glutamate Receptors in the Central Nervous System and their Role in Excitotoxicity, Oxidative Stress and Aging. *Progress in Neurobiology* 54: 369-415, 1998.
- MOLZ, S.; DECKER, H.; DAL-CIM, T.; CREMONEZ, C.; CORDOVA, F. M.; LEAL, R. B.; TASCA, C. I. Glutamate-induced toxicity in hippocampal slices involves apoptotic features and p38 MAPK signaling. *Neurochem Res.* 33(1):27-36, 2008.
- MOLZ, S.; DECKER, H.; OLIVEIRA, I. J. L.; SOUZA, D. O.; TASCA, C. I. Neurotoxicity induced by glutamate in glucose-deprived rat hippocampal slices is prevented by GMP. *Neurochem. Res.* 30: 83-89, 2005.
- MORONI, F. Tryptophan metabolism and brain function: focus on kynurenine and other indole metabolites. *Eur J Pharmacol.* 375: 87–100, 1999.

- NAREDO, I. V.; POEGGELER, B.; SANCHES, V. S.; CABALLERO, B.; ZAPICO, C.T.; GARCIA, O. A.; TOLIVIA, D.; COLUNGA, M. R.; MONTES, A. C. Melatonin neutralizes neurotoxicity induced by quinolinic acid in brain tissue culture. *J Pineal Res.* 39: 266-275, 2005.
- NEDERGAARD, M.; TAKANO, T.; HANSEN, A. J. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nature Rev. Neurosci.* 3: 748-755, 2002.
- NELSON, D. L. & COX, M. M. *Lehninger principles of biochemistry* – 3rd ed. New York, Worth Publishers. 799-814, 2000.
- OBRENOVITCH, T. P. & URENJAK, J. Altered Glutamatergic Transmission in Neurological Disorders: From High Extracellular Glutamate to Excessive Synaptic Efficacy. *Progr. Neurobiol.* 51: 39-87, 1997.
- OLESKOVICZ, S. P.; MARTINS, W. C.; LEAL, R. B.; TASCA, C. I. Mechanism of guanosine-induced neuroprotection in rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation. *Neurochem Int.* 52(3):411-8, 2008.
- PAHAN, K.; SHEIKH, F. G.; NAMBOODIRI, A. M. S.; SINGH, I. Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. *J. Clin. Invest.* 100: 2671-2679, 1997.
- PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83: 346-356, 1977.
- POCOCK, J. M. & NICHOLLS, D. G. Exocytotic and nonexocytotic models of glutamate release from cultured cerebellar granule cells during chemical ischemia. *J. Neurochem.* 70: 806-813, 1998.
- PONCE, J.; DE LA OSSA, N. P.; HURTADO, O.; MILLAN, M.; ARENILLAS, J. F.; DÁVALOS, A.; GASULL, T. Simvastatin Reduces the Association of NMDA Receptors to Lipid Rafts. A Cholesterol-Mediated Effect in Neuroprotection. *Stroke.* 39(4):1269-75, 2008.
- POPESCU, G.; AUERBACH, A. The NMDA Receptor Gating Machine: Lessons from Single Channels. *Neuroscientist.* 10: 192-198, 2004.
- SCHACHTER M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 19, 117–125. 2005.
- SCHAWARCZ, R.; PELLICCIARI, R. Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. *J Pharmacol Exp Ther.* 303: 1-10, 2002.

- SCHAWARCZ, R.; WHETSELL, W. O.; MANGANO, R. M. Quinolinic acid: an endogenous metabolic that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science*. 219: 316-8, 1983.
- SCHMIDT, A. P.; LARA, D. R.; MARASCHIN, J. F.; PERLA, A. S.; SOUZA, D.O. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Res*. 864:40-43, 2000.
- SEGOVIA, G.; PORRAS, A.; DEL ARCO, A.; MORA, F. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech. Ageing Develop*. 122: 1-29, 2001.
- STEPIEŃ, K.; TOMASZEWSKI, M.; CZUCZWAR, S. J. Neuroprotective properties of statins. *Pharmacol Rep*. 57(5):561-9, 2005.
- STONE, T. W. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol. Rev*. 45: 309-379, 1993.
- STONE, T. W.; DARLINGTON, L. G. Endogenous Kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*. 1: 609-620, 2002.
- STÜVE, O.; YOUSSEF, S.; STEINMAN, L.; ZAMVIL, S. S. Statins as potential therapeutic agents in neuroinflammatory disorders. *Curr. Opin. Neurol*. 16: 393-401, 2003.
- SWANSON, C. J.; BURES, M.; JOHNSON, M. P; LINDEN, A.; MONN, J. A; SCHOEPP, D. D. Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. *Nat Rev Drug Discov*. 4: 131-144, 2005.
- TAKAHASHI, M.; BILLUPS, B.; ROSSI, D.; SARANTIS, M.; HAMANN, M.; ATTWELL, D. The Role of Glutamate Transporters in Glutamate Homeostasis in the Brain. *J. Exper. Biol*. 200: 401-409, 1997.
- TAKEMOTO, M. & LIAO, J. K. Pleiotrophic Effects of 3-Hydroxi-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 21: 1712-1719, 2001.
- TAVARES, R. G.; TASCA, C. I.; SANTOS, C. E.; ALVES, L. B.; PORCIÚNCULA, L. O.; EMANUELLI, T.; SOUZA, D. O. Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. *Neurochem. Int*. 40: 621-627, 2002.

- VAUGHAN, C. J. Prevention of Stroke and Dementia with Statins: Effects Beyond Lipid Lowering. *Am. J. Cardiol.* 91(suppl): 23B-29B, 2003.
- VAUGHAN, C. J. & DELANTY, N. Neuroprotective Properties of Statins in Cerebral Ischemia and Stroke. *Stroke* 30: 1969-1973, 1999.
- WALLIS, R. A.; PANIZZON, K Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors provides protection against depolarization to CA1 pyramidal neurons in rat hippocampal slices. *Epilepsia.* 46, Suppl. 8, 2005.
- WATERS D. D. Safety of high-dose atorvastatin therapy. *Am. J. Cardiol.* 96, 69F-75F, 2005.
- WHITTEMORE, E. R.; LOO, D. T.; WATT, J. A.; COTMAN, C. W. A detailed analysis of hydrogen peroxide-induced cell death in primary neuronal culture. 67(4):921-32, 1995.
- WOLOZIN, B.; KELLMAN, W.; RUOSSEAU, P.; CELESIA, G. G.; SIEGEL, G. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxi-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch. Neurol.* 57: 1439-1443, 2000.
- YRJÄNHEIKKI, J.; KOISTINAHO, J.; KETTUNEN, M.; KAUPPINEN, R. A.; APPEL, K.; HÜLL, M.; FIEBICH, B. L. Long-term protective effect of atorvastatin in permanent focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 1052(2):174-9, 2005.
- ZACCO, A.; TOGO, J.; SPENCE, K.; ELLIS, A.; LLOYD, D.; FURLONG, S.; PISER, T. 3-Hydroxi-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors Protect Cortical Neurons from Excitotoxicity. *J. Neurosci.* 23: 1104-11111, 2003.